

苍术 DNA 分离及 RAPD 遗传多样性分析*

任冰如 於虹 贺善安

(江苏省植物研究所, 江苏省植物迁地保护重点实验室, 南京 210014)
中国科学院

摘要 用新鲜的或 -75°C 保存的苍术 (*Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.) 叶片提取 DNA, 产量分别为 40 ng/mg 鲜重和 10 ng/mg 鲜重左右, 分离出的 DNA 的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值均大于 1.9, 可用于 RAPD 试验。用 8 种引物对苍术 4 个居群的 DNA 进行扩增, 单个 10 碱基的引物扩增出的 RAPD 标记在 1~15 之间, 多态位点百分率南苍术为 47.50%, 北苍术为 45.40%, 遗传相似度值南苍术为 0.85, 北苍术为 0.87。结果表明, 南苍术的遗传多样性略高于北苍术。

关键词 苍术; RAPD; 遗传多样性

Isolation of DNA from *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. and genetic diversity analysis with RAPD Ren Bing-Ru, Yu Hong, He Shan-An, (The Provincial Key Laboratory for Plant *Ex Situ* Conservation, Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014), *J. Plant Resour. & Environ.* 1997, 6(4): 1~6

The DNA of fresh or stored (under -75°C) leaves of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. were isolated, the yield is about 40 ng/mg FW and 10 ng/mg FW separately. The $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ values of isolated DNA are all above 1.9, the DNA can be used in the test of RAPD. The amplified results of 4 populations by 8 primers indicated that single 10-base oligonucleotide primer can produce 1 to 15 pieces of DNA fragments. The percentage of polymorphic loci are 47.50% in south *A. lancea* and 45.40% in the north ones, the genetic similarity value is 0.85 in the former and 0.87 in the later, it showed that the genetic diversity level in the south *A. lancea* is slightly higher.

Key words *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.; RAPD; genetic diversity

1. 引言

菊科苍术属 (*Atractylodes* DC.) 植物是我国的传统药材^[1], 不同产地的苍术其生态环境特点、形态结构、化学成分乃至药用价值都有差异。武田认为, 苍术的化学成分及形态特征等属于遗传变异^[2]。如果能获得更为直接的遗传学证据, 将能更深入地了解苍术的遗传变异特性。

同工酶作为一种直接的基因产物, 可以用作遗传标记, 目前已对不同来源的苍术作了大量的等位酶分析研究^[3,4]。自从 1990 年 RAPD 技术建立以来^[5,6], 该技术得到了广泛的应用。它克服了同工酶位点偏少的缺点, 并且直接对基因组 DNA 进行检测, 可为物种进化和分类提

* 国家自然科学基金资助项目和中日苍术资源与种质评价合作研究项目
收稿日期 1997-06-20

供 DNA 分子水平的证据。因此,作者将 RAPD 技术用于苍术的遗传多样性研究。

2. 材料与方 法

2.1 材 料

从野外收集的苍术 [*Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.] 种源栽培于江苏省·中国科学院植物研究所种质保存圃,实验所测 4 个苍术居群来源分别是 Xu:江苏金坛薛埠;Lu:湖北丹江口罗店;Tt:山东泰安;Lao:山东崂山。其中 Xu 和 Lu 是南苍术(South *A. lancea*), Tt 和 Lao 是北苍术(North *A. lancea*)。

2.2 实验方法

2.2.1 DNA 的提取

采集新鲜叶片置 -75°C 冰箱内保存,参照 R. V. Buren^[7] 的方法并作修改提取 DNA。提取介质组成为: 100 mmol/L Tris (pH 8.0), 50 mmol/L EDTA (pH 8.0), 500 mmol/L NaCl, 2% SDS, 1% β -巯基乙醇。称取 1~3 g 叶片加入 5 ml 提取介质,磨成匀浆, 65°C 放置 30 min,加入 2.5 ml 5 mol/L KAc,冰浴放置 20 min 后离心取上清液,加入 2/3 体积的异丙醇,15 000 g 离心 10 min,沉淀用 1 ml TE 缓冲液 [10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mmol/L EDTA (pH 8.0)] 溶解,12 000 g 离心 15 min,除去少量沉淀,上清液用冷乙醇沉淀 1 次,再用氯仿:异戊醇 = 24:1 抽提 1 次,最后用无水乙醇沉淀,所得 DNA 溶于适量 TE。

2.2.2 DNA 的扩增

2.2.2.1 仪器和试剂 所用的引物购自美国 Operon 公司, Taq DNA 聚合酶购自上海 Promega 公司,扩增仪为 PE 公司的 PE9600 基因扩增仪。

2.2.2.2 反应体系 10 \times RAPD 缓冲液,其组成为 100 mmol/L Tris-Cl (pH 8.3), 500 mmol/L KCl, 0.01% Gelatin, 2.0 mmol/L MgCl_2 , 0.65 $\mu\text{mol/L}$ 引物, 0.8 U Taq 酶, 0.2 mmol/L 4 \times dNTPs。

2.2.2.3 扩增程序 94°C 预变性 2 min 后进入以下循环, 94°C 变性 20 s, 36°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min 30 s, 40 个循环后,再在 72°C 下延伸 10 min。

2.2.2.4 电泳 扩增反应结束后,用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 溴化乙啶染色。电极缓冲液为 0.5 \times TBE 缓冲液 (0.45 mol/L Tris, 0.45 mol/L 硼酸, 0.01 mol/L EDTA, pH 8.3)。在 2.5 V/cm 电场下电泳 5 h, 紫外灯下观察照相。

2.3 数据分析

根据扩增结果,计算多态位点百分率。任意两个体间的遗传相似度值(S)按下式计算: $S = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ 式中 N_{xy} 是 x、y 两个体共有的 RAPD 标记数, N_x 和 N_y 分别为 x 和 y 个体所具有的 RAPD 标记数。

3. 结果与分析

3.1 模板 DNA 的检测

3.1.1 紫外分光光度法检测

所提取的苍术总 DNA,用紫外分光光度法检测其纯度,分别测定波长为 260 nm 和 280 nm 时吸光值,并计算 OD_{260} 与 OD_{280} 之比值,所提取的 DNA 溶液该比值均大于 1.9(表 1),说明 DNA 纯度较高^[8]。

3.1.2 琼脂糖凝胶电泳检测及 DNA 定量

将 DNA 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙啶染色。所分离的 DNA 电泳后呈现一清晰的条带。用不同浓度的 Lambda DNA 与样品 DNA 同时电泳,对 DNA 进行定量,由此计算出 DNA 的产率。一般新鲜样品产率较高,约 40 ng/mg 鲜重,超低温下保存的样品产率较低,约 10 ng/mg 鲜重(表 2)。

表 1 用紫外分光光度法检测苍术 DNA 的纯度

Tab 1 The purity of DNA in leaves of *Atractylodes lancea* tested with ultraviolet spectrophotometer

材料编号 Sample No.	OD_{260}	OD_{280}	OD_{260}/OD_{280}
1	0.204	0.103	1.980
2	1.077	0.549	1.962
3	0.401	0.192	2.090
4	0.046	0.018	2.560
5	0.175	0.088	1.988

表 2 苍术叶片 DNA 的琼脂糖凝胶电泳定量测定

Tab 2 The amount of DNA in leaves of *Atractylodes lancea* calculated by agarose gel electrophoresis

植株编号 Sample No.	叶片鲜重 Leaves' fresh weight (g)	DNA 浓度 DNA concentration (ng/ μ l)	DNA 体积 DNA volume (μ l)	DNA 产率 DNA yield (ng/mg FW)	平均产率 Average yield (ng/mg FW)
新鲜样品 Fresh leaves					40.3
Lu8	3.5	120	1200	41.1	
Lu52	3.1	120	1000	38.7	
Lu26	3.5	120	1200	41.1	
-75℃ 保存 Stored under -75℃					9.8
Tt3	2.5	160	100	6.4	
Tt49	2.4	160	200	13.3	
Tt30	1.7	160	100	9.5	
Lao12	2.1	160	100	7.6	
Lao43	1.8	160	100	8.9	
Xu36	0.5	20	200	8.0	
Xu44(2)	1.1	80	200	14.6	

3.2 DNA 的扩增

3.2.1 RAPD 反应参数的确定

为了获得较好的扩增结果,分别进行了 dNTPs、 $MgCl_2$ 、引物、模板等在不同浓度下对扩增反应影响的试验。试验结果表明,适宜的参数为 dNTPs: 0.2 mmol/L, $MgCl_2$: 1.5~2.0 mmol/L, 引物: 0.4~0.6 μ mol/L, 模板: 0.12~4 ng/ μ L。

由于不同批次的 Taq DNA 聚合酶活性有差异,还需确定适宜的 Taq 酶用量。实验中在 10 μ l 反应体系内分别加入 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 1.1 (U) 的酶,扩增结果见图 1。随着酶量的增加,扩增强度增加,表现在条带的数量和亮度同时增加。当酶用量在 0.4 U 以上时,可以扩增出数量较多的条带,低于 0.3 U 时,有些片段不能被检出。

3.2.2 DNA 扩增结果

所用材料每个居群选 2~3 株,用 40 个引物(Operon 公司引物 Kit 中的 L 和 N 组引物)进行扩增,其中 8 个引物能得到良好的结果。实验中,单个 10 碱基的引物扩增出的 RAPD 标记

在 1~15 之间,用 8 个引物扩增,每个苍术单株平均获得约 60.6 条带,每个引物提供平均 7.6 个标记的信息,见表 3。图 2 列举了 OPL-09, OPL-17 二种引物扩增产物的电泳带型。

表 3 用于苍术 DNA 随机扩增的引物及其扩增片断数目
Tab 3 The random primers used for the detection of polymorphism in *Atractylodes lancea* and the number of polymorphic fragments

引物 Primer	5'→3'序列 5'→3' sequence	扩增带数 Fragment number
OPL-07	AGGCGGGAAC	4~6
OPL-09	TGCGAGAGTC	6~10
OPL-11	ACGATGAGCC	7~10
OPL-17	AGCCTGAGCC	10~14
OPN-05	ACTGAACGCC	1~2
OPN-07	CAGCCCAGAG	11~15
OPN-09	TGCCGGCTTG	7~10
OPN-20	GGTGCTCCGT	5~6

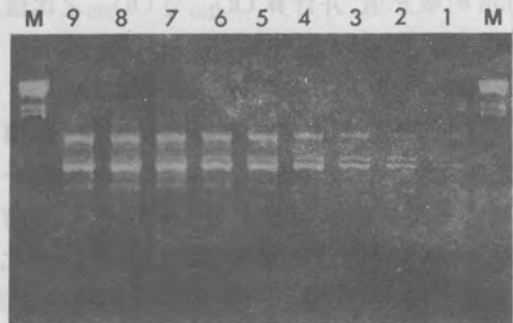


图 1 不同浓度 Taq 酶对扩增反应的影响

Fig 1 The effect of different concentration of Taq DNA polymerase on the amplified reaction

Total volume: 10 μ l; concentration of reagents: 4 \times dNTPs: 0.2 mmol/L, primer: OPN-07 0.4 μ mol/L, templet: 0.5 ng/ μ l, Taq DNA polymerase: 1. 0.1U, 2. 0.2U, 3. 0.3U, 4. 0.4U, 5. 0.5U, 6. 0.6U, 7. 0.7U, 8. 0.8U, 9. 1.1U; M: λ DNA Hind III

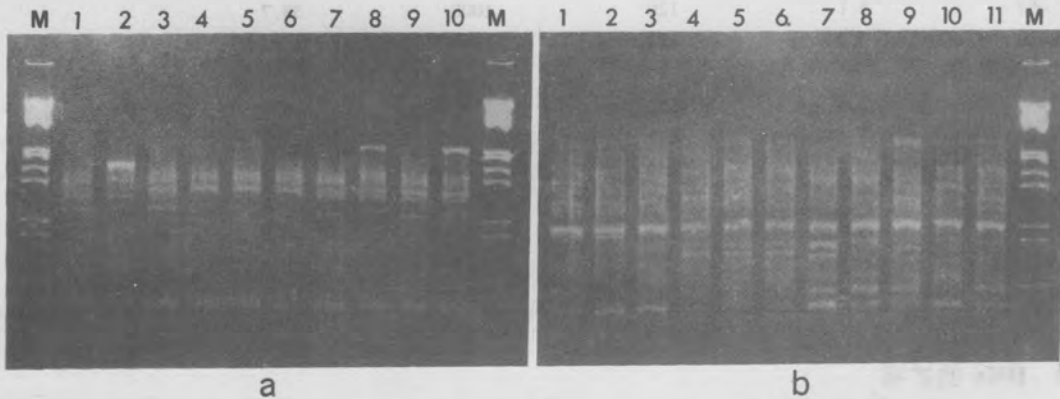


图 2 引物 OPL-09(a)和 OPL-17(b)扩增苍术基因组 DNA 的带型

Fig 2 Band patterns of the DNA in *Atractylodes lancea* amplified using primer OPL-09 (a) and OPL-17 (b)

1. Tt3, 2. Tt30, 3. Tt49, 4. Lao12, 5. Lao7, 6. Lao43, 7. Xu36, 8. Xu44(2), 9. Xu16, 10. Lu26, 11. Lu58, M. λ DNA ECOR I/Hind III

3.3 遗传多样性分析

3.3.1 多态位点百分率

根据扩增结果,分别在单个居群、南苍术和北苍术、苍术总体 3 个水平上统计 RAPD 多态位点数,并计算多态位点百分率,结果列于表 4。

由表 4 可见,4 个居群多态位点百分率由小到大的次序为 Lu, Tt, Xu, Lao。南苍术与北苍术相比,南苍术的多态位点百分率略高于北苍术,说明南苍术比北苍术有更丰富的遗传多样性的趋势,但并不显著。

表 4 苍术总体和居群水平上的 RAPD 多态位点比较

Tab 4 Comparison of RAPD's polymorphic loci of *Atractylodes lancea* on population and total level

群体名称 Group	个体数 Sample number	引物数 Primer number	位点总数 Total loci	多态位点数(占总数%) Polymorphic loci (account for %)
Lu	2	8	66	11(16.67)
Xu	3	8	69	15(21.74)
Lao	3	8	68	18(26.47)
Tt	3	8	68	12(17.65)
南苍术 South <i>A. lancea</i>	5	8	80	38(47.50)
北苍术 North <i>A. lancea</i>	6	8	77	35(45.45)
苍术总体 Total	11	8	87	51(58.62)

* Lu 和 Xu 两个居群是南苍术, Lao 和 Tt 两个居群是北苍术 South *A. lancea* includes population Lu and Xu, north *A. lancea* includes population Lao and Tt.

3.3.2 遗传相似度分析

8 种引物扩增得到的条带,用遗传相似度进行分析。计算结果列于表 5。由表 5 可见,4 个居群的遗传相似度值总平均为 0.85,每个居群遗传相似度值的平均数均在 0.91 以上。根据表 5 计算,以南苍术为一个群体,则南苍术群体内的遗传相似度值为 0.85,北苍术群体内的遗传相似度值为 0.87,南北苍术之间为 0.83。由此可见,苍术居群内的遗传相似度值均大于居群间的遗传相似度值,就 4 个居群总的变异而言,居群间的贡献大于居群内的贡献;南苍术群体内的遗传相似度值略小于北苍术,说明南苍术与北苍术相比有分化程度趋高的倾向,此结果与计算多态位点百分率得到的结果一致。

表 5 苍术 8 个引物 RAPD 标记的平均遗传相似度值(S)

Tab 5 Pairwise similarity between populations of *Atractylodes lancea* of RAPD markers using 8 primers

个体 Individual	Lu58	Lu26	Xu16	Xu44(2)	Xu36	Lao43	Lao7	Lao12	Tt49	Tt30	Tt3
Lu58	-										
Lu26	0.94	-									
Xu16	0.81	0.81	-								
Xu44(2)	0.79	0.79	0.96	-							
Xu36	0.80	0.78	0.90	0.92	-						
Lao43	0.86	0.84	0.85	0.80	0.82	-					
Lao7	0.89	0.87	0.84	0.83	0.78	0.91	-				
Lao12	0.89	0.84	0.85	0.83	0.79	0.91	0.93	-			
Tt49	0.86	0.84	0.81	0.80	0.78	0.83	0.86	0.83	-		
Tt30	0.89	0.90	0.85	0.85	0.82	0.85	0.88	0.85	0.90	-	
Tt3	0.83	0.83	0.81	0.81	0.77	0.80	0.82	0.80	0.94	0.89	-

4. 讨 论

(1) 在所取材料中,南苍术的两个居群 Lu 和 Xu,按武田^[2]的划分,分别为化学型 II 和化学型 III,北苍术的两个居群 Tt 和 Lao 均为化学型 III。本试验用 8 种单引物的 RAPD 检测苍

术,表明南苍术的遗传多样性有高于北苍术的趋势,与武田报道的结果一致。贺善安、朱晓琴¹⁾用同工酶方法检测苍术群体的遗传多样性,与在形态和化学上的分化趋势不太一致,认为可能是等位酶所反映的仅是酶位点上的变异情况,不一定能代表这个物种整个基因组的多样性水平。RAPD技术与同工酶分析相比能产生更多的位点,更全面地反映基因组的变异情况。将两种方法获得的结果相互补充进行综合分析,可以更全面地反映苍术的遗传多样性。

(2) DNA的提取与纯化是进行RAPD扩增的首要步骤,本方法所用试剂价格低廉,操作简单,对新鲜材料和超低温下保存的材料都可以使用,所取得的DNA纯度较高,可以满足RAPD试验的需要。但新鲜样品DNA产率较高,因此最好采用新鲜材料来提取DNA。

(3) 由于使用单个10碱基的随机引物及较低的退火温度,并且Taq酶不具有3'→5'外切酶活性^[8],RAPD反应自身常会产生错误。RAPD反应灵敏,改变Mg²⁺、Taq酶、dNTPs、模板及引物的浓度,均会引起扩增带型的变化,试验中将循环次数由40次减少到30次,产率有所降低,带型有所改变。因此进行RAPD分析应选择适宜的反应条件并加以严格控制。

(4) 汪小全等^[9]发现,就总体而言,随着取样数目的增加,多态位点百分率相应有所提高,但两者不成直线关系。Nei^[10]认为对所用样本数较少的群体,通过分析大量的基因位点可以部分抵消由样本数较少引起的误差。而增加引物的数目,是RAPD获得大量基因位点的重要措施。本试验中我们所取的材料个体数或引物数目相对来说还显不够,不足以反映整个群体的实际情况。因此要进行更深入的分析,还必须选取足够的样本个体和增加引物的数量。

参 考 文 献

- 1 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典,一九九〇年版(一部). 北京:人民卫生出版社、化学工业出版社. 1990.
- 2 武田修已,三木荣二,寺林进等. 中国に生育するシナオクテ *Atractylodes lancea* 精油成分の变异. *Natural Medicines*, 1995, 49(1): 18~23.
- 3 朱晓琴,贺善安. 苍术(*Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.)种内遗传多样性分析. *植物资源与环境*, 1995, 4(2): 1~6.
- 4 朱晓琴,贺善安,姚青菊等. 苍术化学与同工酶的比较. *中国药学杂志*, 1995, 30(suppl.): 81~82.
- 5 Williams J G K, Kubelik A R, Livak J *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(22): 6531~6535.
- 6 Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(22): 7213~7218.
- 7 Buren R V, Harper K T, Andersen W R *et al.* Evaluating the relationship of autumn buttercup (*Ranunculus acris* var. *aestivalis*) to some close congeners using random amplified polymorphic DNA. *American Journal of Botany*, 1994, 81(4): 514~519.
- 8 李德葆,徐平主编. 重组DNA的原理和方法. 杭州:浙江科学技术出版社, 1994.
- 9 汪小全,邹喻苹,张大明等. 银杉遗传多样性的RAPD分析. *中国科学(C辑)*, 1996, 26(5): 436~441.
- 10 Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 1978, 89: 583~590.

(责任编辑:惠红)

1) 江苏省·中国科学院植物研究所,日本津村(株)中央研究所. 1993~1996年度苍术资源调查与种质评价合作研究总结. 1996. 12~20.